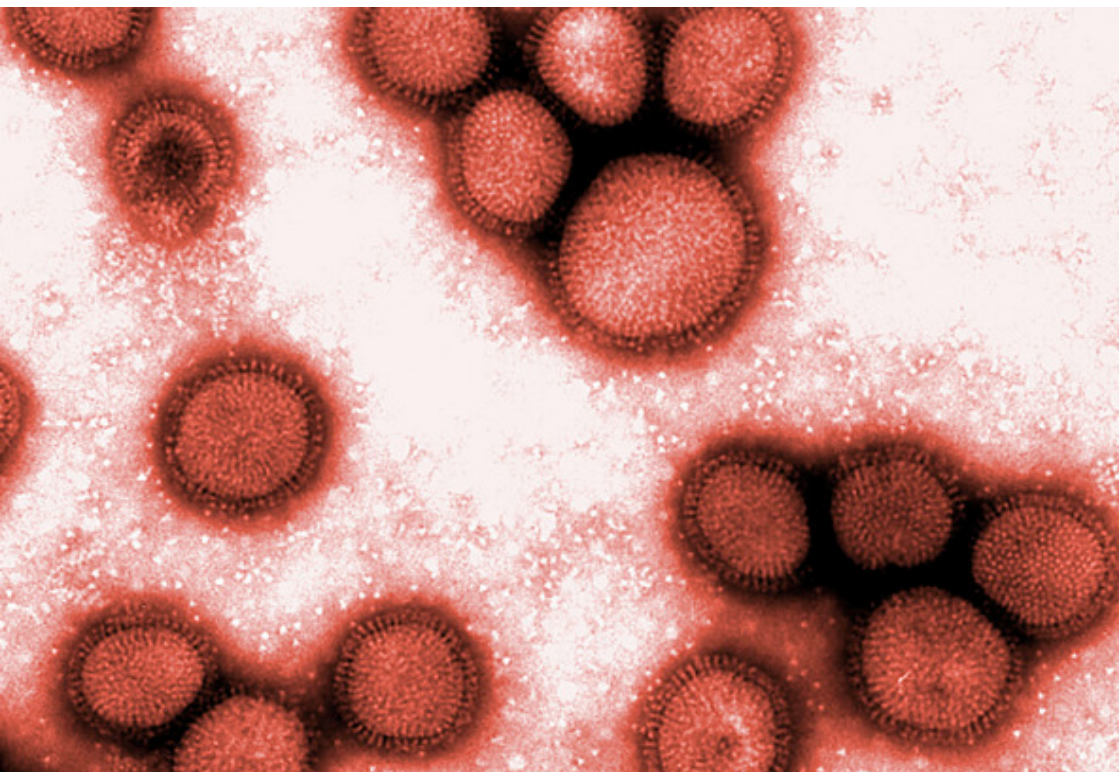


**Avaliação da Presença do Vírus
Influenza em Suínos no Sul do Brasil**



ISSN 1678-8842

Versão Eletrônica

Dezembro, 2008

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Embrapa Suínos e Aves

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 10

Avaliação da Presença do Vírus Influenza em Suínos no Sul do Brasil

Rejane Schaefer

Iara Maria Trevisol

Ediane Paludo

Embrapa Suínos e Aves

Concórdia, SC

2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Suínos e Aves

Rodovia BR 153 - KM 110
89.700-000, Concórdia-SC
Caixa Postal 21
Fone: (49) 3441 0400
Fax: (49) 3441 0479
<http://www.cnpsa.embrapa.br>
sac@cnpsa.embrapa.br

Comitê de Publicações da Embrapa Suínos e Aves

Presidente: Cícero J. Monticelli
Secretário-Executivo: Tânia M.B. Celant
Membros: Teresinha M. Bertol
Jean C.V.B. Souza
Gerson N. Scheuermann
Airton Kunz
Valéria M. N. Abreu
Suplente: Arlei Coldebella

Coordenação editorial: Tânia M.B. Celant
Revisão técnica: Jalusa D. Kich, Jean C.V.B. Souza, Paulo A. Esteves e Nelson Morés
Normalização bibliográfica: Irene Z.P. Camera
Editoração eletrônica: Vivian Fracasso
Foto(s) da capa: <http://encyclopedia.com/doc/1E1-influenza.html>

1ª edição

Versão eletrônica (2008)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Suínos e Aves

Schaefer, Rejane.

Avaliação da presença do vírus influenza em suínos no sul do Brasil / Rejane Schaefer, Iara Maria Trevisol, Ediane Paludo. – Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2008.

18 p.; 21cm. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/ Embrapa Suínos e Aves, ISSN 1678-8842; 10).

1. Suínos – doenças. 2. Vírus influenza. I. Trevisol, Iara Maria. II. Título. III. Série.

CDD 636.40896

© Embrapa 2008

Sumário

Resumo.....	5
Abstract.....	7
Introdução.....	9
Metodologia.....	10
Resultados e Discussão.....	12
Conclusão.....	15
Referências	16

Avaliação da Presença do Vírus Influenza em Suínos no Sul do Brasil

Rejane Schaefer¹
Iara Maria Trevisol²
Ediane Paludo³

Resumo

O vírus influenza (SIV) é um dos agentes infecciosos envolvidos em surtos de doença respiratória aguda em suínos, agindo como agente primário de lesões no aparelho respiratório e também como responsável pelo agravamento de quadros respiratórios pela co-infecção com outros agentes infecciosos. Em suínos, a doença é considerada endêmica e os animais são considerados portadores dos subtipos A/H1N1, A/H3N2 e A/H1N2. Buscando identificar quais subtipos virais que circulam em suínos no Sul do Brasil, este trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização de amostras do vírus influenza. Para isto, foram

¹ Médica veterinária, D.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia – SC, e-mail: rejane@cnpa.embrapa.br.

² Médica veterinária, M.Sc. em Ciências Veterinárias, pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia – SC, e-mail: iara@cnpa.embrapa.br.

³ Acadêmica do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Contestado - UnC, bolsista PIBIC- CNPq, Concórdia – SC, e-mail: ediane.paludo@gmail.com

coletadas 281 amostras de secreção nasal de suínos oriundos de 29 criações comerciais no Sul do Brasil, com e sem histórico de ocorrência de problemas respiratórios. Para o isolamento viral foram preparadas suspensões de suabes da cavidade nasal dos suínos, as quais foram inoculadas em ovos embrionados de galinhas. Os fluidos alantóides dos ovos inoculados foram testados pelo teste de hemaglutinação (HA) o qual revelou que 47 amostras foram positivas pelo teste, e 234 negativas. As amostras positivas pelo teste de HA foram analisadas por PCR. Três amostras foram consideradas positivas, mas não foi possível obter DNA suficiente para ser submetido à reação de sequenciamento do DNA para confirmação da suspeita.

Termos para indexação: influenza suína, PCR, gene da matriz.

Assessment of the Presence of Influenza Viruses in Pigs in Southern Brazil

Abstract

Swine influenza virus (SIV) is an infectious agent involved in outbreaks of acute respiratory disease in swine. SIV acts as a primary agent of lesions in the respiratory tract and is also responsible for the aggravation of respiratory symptoms by coinfection with other microorganisms. The disease is endemic in swine which are reservoirs for viral subtypes A/H1N1, A/H3N2 e A/H1N2. In order to identify which viral subtypes circulates in swine populations in South Brazil, the present study aimed the isolation and characterization of influenza virus. Thus, 281 samples from nasal swabs, 29 commercial herds with and without historic of respiratory diseases, in South Brazil, were collected. In attempting to isolate influenza virus, embryonated eggs were inoculated with swabs suspensions. Forty-seven samples were considered positive by haemagglutination test (HA) and 234 were negative. HA positive samples were analysed by PCR. After PCR, three

samples were considered positive. However, we could not have enough viral DNA to sequence for confirmation.

Index terms: swine influenza, PCR, matrix gene.

Introdução

O vírus influenza é um patógeno altamente infeccioso responsável por surtos de doença respiratória aguda em suínos, a influenza suína. É uma zoonose cuja importância aumentou nos últimos anos em virtude dos casos de influenza aviária altamente patogênica ocorridos em países do Sudeste Asiático. Os vírus influenza são geralmente espécie-específicos. Todavia, existe a possibilidade de transmissão de vírus de uma espécie a outra. A partir disto, e devido a possibilidade de troca de segmentos gênicos entre vírus originários de diferentes espécies animais, podem surgir novos vírus contendo diferentes combinações de genes. Os suínos, ao contrário das aves e humanos, foram identificados como a única espécie que contém receptores celulares tanto para vírus de origem aviária como humana e são suscetíveis a infecção com todos os subtipos de vírus aviário até hoje testados (H1-H13). Desta forma, os suínos participariam do ciclo de influenza como hospedeiros intermediários, importantes para a transmissão do vírus de aves a humanos.

Portanto, o estabelecimento de um sistema de monitoramento das infecções causadas pelo vírus influenza em suínos, ainda inexistentes no Brasil, é importante uma vez que o suíno funcionaria como um sentinela para epidemias de influenza em humanos e aves e também como modelo para a investigação do vírus influenza. O monitoramento das populações suínas visando a identificação de vírus influenza "tipo aviário" faz parte de um plano mundial preconizado pela Organização Mundial de Saúde (WHO) e pela Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE) para o combate às infecções causadas pelo vírus influenza em humanos e animais domésticos. Desta forma, este trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização de amostras do vírus influenza em suínos, visando identificar os subtipos virais que circulam nesta espécie animal.

Metodologia

Amostra de vírus do controle positivo: para a padronização dos testes foi utilizada uma amostra isolada de um suíno nos EUA (A/sw/H1N1/Nebraska VDL case 37181; Universidade de Nebraska, USA).

Amostras de campo: Durante os anos de 2005 e 2006 foram coletadas, aleatoriamente, duzentas e oitenta e uma (281) amostras de secreção nasal de suínos oriundos de 29 granjas de criação comercial de suínos localizadas na região Oeste do estado de Santa Catarina. Foram coletados animais na fase de crescimento com 76 a 190 dias de idade. As amostras foram coletadas com suabe nasal e armazenadas em meio de cultivo contendo uma solução de antibióticos. As amostras foram mantidas resfriadas durante o transporte e armazenadas a -70°C até o processamento.

Inoculação de ovos SPF e detecção de atividade hemaglutinante (HA): para as tentativas de isolamento viral cada amostra foi inoculada em 5 ovos embrionados de galinhas *specific pathogen free* (SPF) de 9 a 11 dias de idade. Os ovos inoculados foram mantidos em estufa a 37°C durante 4 dias. Após 4 passagens em ovos, os fluidos alantóides coletados foram analisados quanto à presença de atividade HA. As amostras positivas foram armazenados a -70°C e submetidas a caracterização molecular por RT-PCR.

Inoculação das amostras em células da linhagem MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*): células da linhagem MDCK, adquiridas comercialmente, foram mantidas em garrafas de cultivo celular contendo o meio DMEM e 10% SFB. Para a inoculação do vírus nas células foi utilizado um meio de infecção (DMEM + tripsina) contendo 2µL/mL de tripsina (solução estoque: 2mg/mL). Após 24 ou 48 horas de cultivo em estufa a 37°C o sobrenadante (SN) de cultivo foi coletado, clarificado por centrifugação a 5000 rpm durante 20 minutos e armazenado a -70°C até o uso.

Extração de RNA e síntese do DNA complementar (cDNA): A extração de RNA viral foi realizada a partir dos fluidos alantóides dos ovos inoculados com as amostras de campo e a partir do SN de cultivo das células MDCK inoculadas com a amostra H1N1. O RNA foi extraído com Trizol (Invitrogen), de acordo com recomendações do fabricante. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o primer randômico e a enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen).

PCR: foi amplificada uma sequência do gene que codifica a proteína da matriz (M) do vírus de influenza (PCR/M). Foram utilizados os *primers forward*- M52C: 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACG-3' e *reverse*- M253R: 5'-AGGGCATT TTTGGACAAAGTCGTCTA-3', os quais amplificam um fragmento com 244 pares de base (pb). A reação de PCR foi realizada com 2µL cDNA, 50mM Tris-HCl (pH 8,5), 50mM NaCl, 7mM MgCl₂, 2mM ditiotreitol, 1mM de cada dNTP e 2,5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen). O programa utilizado no termociclador foi o seguinte: 95°C- 4 minutos 1x, 40 ciclos (95°C- 1 minuto, 45°C- 1 minuto e 72°C- 3 minutos) seguido de um ciclo adicional de 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 1 %, sob luz UV.

Random amplified polymorphic DNA - RAPD: foram testadas por RAPD as amostras de DNA consideradas positivas fracas na RT-PCR. O teste foi realizado de acordo com recomendações do fabricante (Amersham Biosciences).

Resultados e Discussão

Após serem realizadas quatro passagens de cada amostra em ovos embrionados, os fluidos alantóides dos mesmos foram coletados para a realização do teste de HA utilizando hemácias de galinhas. Quarenta e quatro (44) amostras foram consideradas positivas pelo teste de HA e duzentas e trinta e sete (237) foram consideradas negativas.

Entretanto, quando foram utilizadas no teste hemácias de perus, mais três (3) amostras foram consideradas positivas, totalizando quarenta e sete (47) amostras hemaglutinantes. Os eritrócitos de perus apresentam, predominantemente, receptores sialo-oligossacarídeos terminados por ácido *N*-acetilsilático ligado a galactose por ligação α -2,6 (NeuAc α 2,6Gal), reconhecidos como receptores de células preferenciais para a ligação dos vírus influenza de origem de suínos, sendo portanto, importantes na identificação de vírus encontrados nesta espécie.

Como uma alternativa ao isolamento viral em ovos embrionados foi padronizado o isolamento em células da linhagem MDCK, consideradas permissíveis aos vírus influenza. No presente trabalho, o vírus controle positivo (H1N1) foi inoculado em células MDCK e, após 24hs de cultivo, o RNA viral foi extraído das células infectadas (Fig. 1). Este método apresentou como vantagem um menor período de tempo para a obtenção dos vírus, quando comparado com o isolamento viral padrão em ovos embrionados onde são necessárias, pelo menos, três passagens para a multiplicação viral, o que leva em torno de 3 semanas. Entretanto, estes resultados dizem respeito a uma amostra de vírus possivelmente já adaptada a ovos embrionados. Este trabalho não avaliou o isolamento de amostras de campo do vírus influenza em células.

Posteriormente, as amostras que apresentaram positividade no teste de HA foram analisadas por PCR. Para isto, foi otimizada uma reação de PCR a qual amplifica uma sequência do gene da matriz (M) do vírus influenza. A PCR/M amplifica um fragmento do genoma de vírus isolados de diferentes espécies animais (aves, suínos e humanos),

permitindo o monitoramento desta infecção em outras espécies, sendo utilizada, neste trabalho, para a triagem das amostras HA positivas. Após a análise das amostras de campo com a PCR/M foram identificadas 3 amostras que apresentaram bandas fracas, após a eletroforese em gel de agarose, com tamanho compatível com a amplificação de um fragmento do gene M (244pb) do vírus influenza (Fig. 2). Entretanto, não foi possível recuperar DNA suficiente para a reação de sequenciamento. Desta forma, com o objetivo de identificar nas amostras coletadas de suínos outros vírus que poderiam causar infecção nesta espécie, foi realizado o teste de RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*; Amersham Biosciences) a partir do cDNA das amostras consideradas positivas pelo teste de HA. O teste de RAPD é uma técnica utilizada para detectar polimorfismos genômicos utilizando para isto um único primer oligonucleotídeo curto e de sequência arbitrária em uma reação de PCR. A reação de PCR é realizada em condições de baixa estrigência de forma a gerar um arranjo reprodutível de produtos sequência-específicos que são analisados por eletroforese. Os produtos da PCR, após passarem por um processo de purificação, podem ser analisados através do sequenciamento de DNA. Entretanto, após ser realizada a reação de RAPD, somente foram verificados fragmentos de DNA na amostra controle positivo do teste (DNA de *E. coli*) e bandas fracas quando utilizou-se cDNA da amostra controle positiva (H1N1). Neste caso, não foi possível detectar sequências do vírus de influenza e nem de outros vírus que poderiam infectar suínos.

Muito embora não tenha sido possível obtermos um resultado conclusivo no isolamento do SIV em suínos, é sabido que o vírus circula nesta espécie. Em um trabalho prévio, desenvolvido pela Embrapa Suínos e Aves, o qual analisou amostras de soro de suínos coletadas entre os anos de 1996 e 1999 foi identificada a presença de anticorpos contra os subtipos H1N1 (em 2,2% dos soros testados) e H3N2 (em 16,7% dos soros testados), subtipos prevalentes em suínos, nos quais a infecção é considerada endêmica. A prevalência desta infecção em suínos poderá ser muito baixa de acordo com as

características de sazonalidade da doença, que pode ser maior no inverno, o que determina uma possível variabilidade na ocorrência da doença e número provável de isolamentos do vírus. A ocorrência de clima tropical na região Sul do Brasil provavelmente tem um papel importante na baixa prevalência de anticorpos contra o SIV detectados em suínos na região.

Esta dificuldade em isolar amostras do vírus influenza em suínos pode ocorrer em virtude da presença de imunidade prévia ao vírus em suínos, o que faz com que o vírus circule sem evidências de sintomatologia clínica. Nestes casos, o vírus funcionaria como porta de entrada para outras infecções respiratórias em suínos. Também, o sucesso do isolamento viral é determinado pela oportunidade ou não de detectar e coletar em tempo o material de animais ainda em fase aguda da doença. O sucesso na detecção do vírus é maior quando as amostras são coletadas na fase inicial da infecção, durante o período febril, nos primeiros 7 dias de doença. Após isto, e em virtude da ocorrência de infecção secundária com outros agentes virais ou bacterianos, as oportunidades de isolar o vírus são menores.

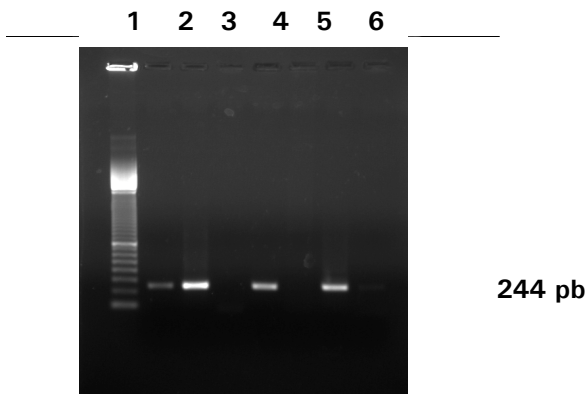


Fig. 1. PCR/ M - H1N1 (extração viral a partir de fluido alantóide de ovos e a partir do SN de células MDCK; 24 e 48 horas de cultivo). L1: Marcador de peso molecular de 100 pb; L2. Líq. alantóide; L3. SN/MDCK 48hs; L4. SN/MDCK (extração dupla); L5. Líq. alantóide (extração dupla); L6. SN/MDCK 48hs (extração dupla); L7. SN/MDCK 24hs; L8. Controle negativo.

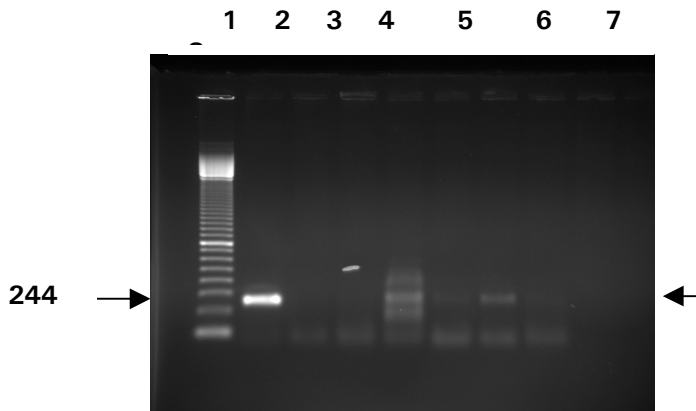


Fig. 2. PCR/M. L1: Marcador de peso molecular de 100 pb; L2: controle positivo, H1N1; L3: amostra 36; L4: amostra 37; L5: amostra 45; L6: amostra 74; L7: amostra 76 e L8: controle negativo.

Conclusões

A dificuldade encontrada no isolamento do SIV em suínos no presente trabalho não exclui a presença do mesmo nos rebanhos suínos no Sul do Brasil, uma vez que a avaliação sorológica dos rebanhos indicou a circulação do vírus influenza na população suína, mas com baixa prevalência.

Mais estudos serão necessários para a confirmação dos resultados encontrados com a PCR/M em 3 das amostras analisadas.

A identificação e o monitoramento de quais subtipos virais são predominantes na população suína somente será possível com a intensificação da vigilância na população suína e avaliação de material colhido de suínos com sintomas da infecção.

Referências

BRENTANO, L.; CIACCI-ZANELLA, J. R.; MORES, N.; PIFFER, I. A. **Levantamento soropidemiológico para Coronavírus respiratório e da Gastroenterite Transmissível e dos Vírus de Influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2002. 6p. (Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, 306).

BROWN, I. H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. **Veterinary Microbiology**, v.74, p.29-46, 2000.

CLAVIJO, A.; TRESNAN, D. B.; JOLIE, R.; ZHOU, E. -M. Comparison of embryonated chickens eggs with MDCK cell culture for the isolation of influenza swine virus. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.66, p.117-121, 2002.

EASTERDAY, B. C.; VAN REETH, K. Swine influenza. In: STRAW, B. E. ; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D .J. (Ed.). **Diseases of swine**. 8. ed. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 277-290.

ERICKSON, G. A.; KRAUSS, S.; LANDGRAF, J. G.; SWENSON, S. L.; GREER-GRAHAM, S. G. New approaches to swine influenza virus isolation. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF VETERINARY LABORATORY DIAGNOSIS, 42., 1999, [S.l.] . **Proceedings**. [S.l.: s.n.], 1999. p.45.

FOUCHIER, R. A. M.; BESTEBROER, T. M.; HERFST, S.; VAN DER KEMP, L.; RIMMELZWAAN, G. F.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 4096-4101, 2000.

ITO, T.; KAWAOKA, Y. Host range barrier of influenza A virus. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p.71-75, 2000.

KIDA, H.; ITO, T.; YASUDA, J.; SHIMIZU, Y; ITAKURA, C.; SHORTRIDGE K. F.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. C. Potential for transmission of avian influenza virus to pigs. **Journal of General Virology** , v.75, p. 2183-2188, 1994.

NINOMIYA, A.; TAKADA, A.; OKAZAKI, K.; SHORTRIDGE, K. F.; KIDA, H. Seroepidemiological evidence of H4, H5, and H9 influenza A virus transmission to pigs in southeastern China. **Veterinary Microbiology**, v.88, p.107-114, 2002.

OLSEN, C. W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. **Virus Research**, v. 85, p. 199-210, 2002.

ROGERS, G. N.; PAULSON, J. C.; DANIELS, R. S.; SKEHEL, J. J.; WILSON, I. A.; WILEY, D. C. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. **Nature**, v. 304, p. 76-78, 1983.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 3 v.

SCHOLTISSEK, C.; BURGER, H.; KISTNER, O.; SHORTRIDGE, K. F. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. **Virology**, v.147, p. 287-294, 1985.

Agradecimentos: às agroindústrias da região (Seara Alimentos e Sadia) que permitiram a coleta de animais das integrações sob sua responsabilidade.

Este trabalho foi realizado com o apoio técnico laboratorial de Tania P. Klein e Magda Mulinari.



**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

